



⑬ BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND

DEUTSCHES
PATENTAMT⑫ Offenlegungsschrift
⑩ DE 41 24 537 A 1⑤① Int. Cl.⁵:

C 12 N 15/11

C 12 N 15/29

C 12 N 15/67

A 01 H 1/00

// (C12N 15/11, C12R
1:91)

②① Aktenzeichen: P 41 24 537.7

②② Anmeldetag: 24. 7. 91

②③ Offenlegungstag: 6. 2. 92

DE 41 24 537 A 1

③③ Innere Priorität: ③② ③③ ③①

31.07.90 DE 40 24 225.0

⑦① Anmelder:

Hoechst AG, 6230 Frankfurt, DE

⑦② Erfinder:

Mass, Christoph, Dipl.-Biol.; Werr, Wolfgang, Dr.,
5000 Köln, DE

⑤④ Steigerung der Genexpression in Pflanzenzellen

⑤⑤ Die DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO : 1 steigert die Genexpression in Pflanzenzellen, wenn diese Sequenz zwischen Promotor und das zu exprimierende Gen eingesetzt wird. Eine weitere, multiplikative Steigerung der Genexpression erhält man, wenn man an die genannte DNA-Sequenz eine weitere DNA-Sequenz koppelt, die im wesentlichen dem Intron 1 aus dem Saccharosesynthase-Gen aus Mais entspricht...

DE 41 24 537 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Verwendung einer DNA-Sequenz aus dem transkribierten, jedoch untranslatierten 5'-Bereich des Saccharosesynthase-Gens aus *Zea mays* L. zur Steigerung der Genexpression in Pflanzenzellen. Die Erfindung betrifft insbesondere eine 39 Basenpaare umfassende Nukleotid-Sequenz aus dem Exon 1 des genannten Gens, Position 4–42 (HincII-Schnittstelle), die im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO: 1 niedergelegt ist.

Das komplette Exon 1 des genannten Gens ist in W. Werr et al., EMBO J. 4 (1985) 1371–1380, insbes. Fig. 3C, beschrieben. Es wurde gefunden, daß die erfindungsgemäße DNA-Sequenz, gekoppelt an einen in Pflanzenzellen wirksamen Promotor und an ein in dieser Zelle zu experimentierendes Gen, die Expression dieses Gens erheblich steigert, wobei in den untersuchten Fällen eine mindestens 10fache Steigerung der Protein-Expression festgestellt werden konnte. Diese Erhöhung der Genexpression wurde mit mono- und dicotyledonen Pflanzenzellen festgestellt.

Die Steigerung der Genexpression in monocotyledonen Pflanzenzellen läßt sich – unabhängig von der erfindungsgemäßen Steigerung – weiterhin wesentlich, d. h. in der gleichen Größenordnung, erhöhen, wenn man an die erfindungsgemäße DNA-Sequenz das im Genom sich anschließende 1,04 kb-große HincII-NcoI-Fragment mit dem Intron 1 aus dem Saccharosesynthase-Gen koppelt. Die Verwendung dieses Fragments zur Steigerung der Genexpression in Pflanzenzellen ist aus V. Vasil et al., Plant Physiol. 91 (1989) 1575–1579, insbes. Fig. 1, bekannt. Die Kombination mit der erfindungsgemäßen DNA-Sequenz ergibt überraschenderweise einen multiplikativen Effekt, d. h. also eine Steigerung der Genexpression um einen Faktor in der Größenordnung 100.

Die Kombination der beiden DNA-Sequenzen erscheint jedoch auf den Einsatz in monocotyledonen Pflanzen beschränkt zu sein, da die das Intron 1 enthaltende DNA-Sequenz bei dicotyledonen Pflanzen in den untersuchten Fällen einzeln oder in Kombination mit der erfindungsgemäßen DNA-Sequenz die Expression des daran gekoppelten Gens behindert. Dieser Effekt könnte auf ein unterschiedliches Spleißen in mono- und dicotyledonen Pflanzenzellen zurückzuführen sein, wie es bereits von B. Keith und N.-H. Chua, EMBO J. 5 (1986) 2419–2495 festgestellt wurde. Es zeigt sich also, daß die beiden Effekte über unterschiedliche Mechanismen wirken.

Bevorzugte erfindungsgemäße Genkonstruktionen und Vektoren enthalten als in Pflanzenzellen wirksame Promotoren vor allem den CaMV 35S oder den Saccharosesynthase-Promotor.

Im Anschluß an das zu experimentierende Gen enthalten die bevorzugten Genkonstruktionen Polyadenylierungs-Regionen aus dem CaMV 35S- oder aus dem Octopinsynthase (OCS)-Gen (Hain et al., Mol. Gen. Genet. 199 (1985) 161–168).

Bei den der Erfindung zugrundeliegenden Untersuchungen wurden als zu experimentierende Gene die bekannten Markergene CAT (Chloramphenicol-Transacetylase) und NPTII (Neomycin-Phosphotransferase) eingesetzt. Selbstverständlich eignet sich die Erfindung auch für die Expression von anderen Genen, beispielsweise Resistenzgenen, wie sie u. a. aus den EP-A 02 57 542 und 02 75 957 bekannt sind, aber auch zur Herstellung von proteinogenen Wirkstoffen in Pflanzen (vgl. DD-A 12 65 164).

Als monocotyledone Modellpflanzen dienten Mais und Reis, woraus die generelle Anwendung in Monocotyledonen ersichtlich ist. Als Modell für dicotyledone Pflanzen diente Tabak (*Nicotiana tabacum*), wodurch die generelle Anwendbarkeit der erfindungsgemäßen DNA-Sequenz auch in dicotyledonen Pflanzen gezeigt ist.

Selbstverständlich ist die Erfindung nicht auf die Anwendung der hier beschriebenen Einzelmerkmale und deren Kombinationen beschränkt. Wie der Fachmann weiß, können sowohl in der erfindungsgemäßen DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 als auch in der das genannte Intron-1 enthaltenden Sequenz Basenaustausche, Ergänzungen oder Deletionen von Basen vorgenommen werden, ohne daß die erfindungsgemäße Wirksamkeit erheblich verändert wird. Desgleichen können gleichwirkende DNA-Sequenzen aus anderen Spezies eingesetzt werden. Derartige Modifikationen sind dem Fachmann geläufig und ohne erfinderisches Zutun auffindbar und gehören deshalb ebenfalls zur Erfindung.

Die Erfindung bezieht sich weiterhin auf erfindungsgemäße transformierte Pflanzenzellen und daraus regenerierte Pflanzen sowie deren Vermehrungsgut.

In den folgenden Beispielen werden besonders bevorzugte Ausgestaltungen der Erfindung näher beschrieben.

Beispiel 1

Plasmidkonstruktionen

Als Ausgangsmaterials diente das Plasmid pRT 101CAT (M. Pröls et al., Plant Cell Reports (1988) 7: 221–224), das in der Fig. 1 unter A wiedergegeben ist. Das darin enthaltene CAT-Gen ist handelsüblich (Pharmacia Inc., 1984, "Molecular Biologicals", S. 73).

In die SmaI-Schnittstelle dieses Plasmids wird die DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 ligiert, wodurch das Plasmid pRT-ex/s-CAT erhalten wird (Fig. 1, B). Durch die 3'-terminalen Cytosin-Reste in SEQ ID NO: 1 dargestellten DNA-Sequenz wird die SmaI-Schnittstelle in pRT101CAT wiederhergestellt.

Als Vergleichsplasmid wird pRT-int/s-CAT hergestellt (Fig. 1, C). Dazu wurde zuerst ein 2,26 Kb PstI/NcoI-Restriktionsfragment (Position –1180 bis +1088) aus einem 16,3 Kb genomischen Klon des Saccharosesynthase-Gens (Geiser et al., EMBO J. 1 (1982) 1455–1460) isoliert, überstehende Enden mit der Nuklease S1 abverse-daut und in die SmaI-Schnittstelle des Plasmids pUC19 ligiert (Fig. 2 – "E" bedeutet "Exon"). Das so erhaltene Plasmid wurde als pSP1076 + 1084 bezeichnet. Nachfolgend wurde ein ca. 1080 Bp langes HincII-Restriktionsfragment (Saccharosesynthase-Sequenzen +43 bis +1084) aus dem Plasmid pSP1076 + 1084 isoliert und in die SmaI-Schnittstelle von pRT101CAT gemäß Fig. 1C eingesetzt.

Beispiel 2

Transformation

Die Herstellung der Protoplasten und deren Transfektion wurden entsprechend C. Maas und W. Werr, Plant Cell Reports (1989) 8: 148–151, durchgeführt. Die Bestimmung der CAT-Aktivität erfolgte ebenfalls wie in dieser Literaturstelle angegeben. Die folgende Tabelle zeigt die relativen CAT-Aktivitäten jeweils 40 Stunden nach Transfektion der Protoplasten, wobei die Aktivität der mit pRT 101CAT transfizierten Protoplasten gleich 1 gesetzt wurde.

	Mais	Reis	Tabak
pRT101CAT	1	1	1
pRT-ex/s-CAT	10	10	10
pRT-int/s-CAT	10–100	10–100	0,1
pRT-ex/s-int/s-CAT	100–1000	100–1000	~1

Beispiel 3

Plasmidkonstruktion mit dem Saccharosesynthase-Promotor und den NPTII-Markergen

Durch Deletion von Upstream-Sequenzen im bereits in Werr und Lörz, Mol. Gen. Genet. 203 (1986) 471–475, beschriebenen Plasmid pSP2014 + 42-NPT (pSKAN1) wurde das Plasmid pSP1176 + 42-NPT (Fig. 3, A) erhalten. Als Vergleich dazu diente das Plasmid pSP1176 + 1084-NPT (Fig. 3, B). Hierzu wurde das NPTII-Markergen inclusive NOS-Polyadenylierungsregion, wie schon in Werr und Lörz beschrieben, aus dem Plasmid pLGV 1103 (Hain et al. a. a. O.) als 2,3 Kb langes BclI/HindIII-Restriktionsfragment isoliert und in BamHI/HindIII gespaltenes pSP1176 + 1084 (Fig. 2) ligiert.

Das Plasmid pSP20 + 42-NPT (Fig. 3, C) wurde ebenfalls durch Deletion von Upstream-Promotorsequenzen in pSP2014 + 42-NPT hergestellt. Als Vergleich dazu diente das Plasmid pSP20 + 6-NPT (Fig. 3, D). Zur Herstellung von pSP20 + 6-NPT wurde das promotorlose Konstrukt pWW114-5NPT (Werr und Lörz, Fig. 3, E) benutzt. Das Saccharosesynthase 20 + 6 Promotorfragment wurde als synthetisches Oligonukleotid hergestellt und in die SmaI-Schnittstelle vor das NPTII-Markergen in pWW114-5NPT ligiert.

Beispiel 4

Transformation

Die Herstellung der Protoplasten und deren Transfektion wurden entsprechend C. Maas und W. Werr, a. a. O., durchgeführt. Die Bestimmung der NPTII-Aktivität erfolgte wie in Reiss et al., Gene 30 (1984) 211–217, beschrieben. Die folgende Tabelle zeigt die relativen NPTII-Aktivitäten jeweils 5 Tage (120 Stunden) nach Transfektion der Protoplasten, wobei die relative Aktivität der mit pSP 1176 + 42-NPT transfizierten Protoplasten gleich 1 gesetzt wurde.

	Mais
pSP1176 + 42-NPT	1
pSP1176 + 1084-NPT	> 10
pSP20 + 42-NPT	1
pSP20 + 6-NPT	0,1

Sequenzprotokoll:

SEQ ID NO: 1

Art der Sequenz: Nucleotid

Sequenzlänge: 39 Basenpaare

Strangform: Doppelstrang

Topologie: linear

Art des Moleküls: Genom-DNA

Ursprüngliche Herkunft

Organismus: Mais (Zea mays, L.)

Unmittelbare experimentelle Herkunft:

synthetisch, entsprechend Exon 1, Position 4-42 (HincII-Schnittstelle), des Saccharosesynthase-Gens, zusätzlich CCC zur Wiederherstellung einer SmaI-Schnittstelle am 3'-Ende.

CCCTCCCTCC CTCCTCCATT GGACTGCTTG CTCCTGTTC CC

Patentansprüche

- 5 1. DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1.
2. Vector, enthaltend die DNA-Sequenz nach Anspruch 1.
3. Vector nach Anspruch 2, enthaltend die DNA-Sequenz nach Anspruch 1, gekoppelt an einen in Pflanzenzellen wirksamen Promotor und an ein in dieser Zelle zu exprimierendes Gen.
10 4. DNA-Sequenz nach Anspruch 1, ligiert an das 1,04 kb-HincII-NcoI-Fragment mit dem Intron 1 aus dem Saccharosesynthese-Gen aus Zea mays L.
5. Vector, enthaltend die DNA-Sequenz nach Anspruch 4.
6. Vector nach Anspruch 5, enthaltend die DNA-Sequenz nach Anspruch 4, gekoppelt an einen in Pflanzenzellen wirksamen Promotor und an ein in dieser Zelle zu exprimierendes Gen.
7. Pflanzenzelle, transformiert mit einem Vector nach Anspruch 2 oder 3.
15 8. Monocotyledone Pflanzenzelle, transformiert mit einem Vector nach Anspruch 2, 3, 5 oder 6.
9. Pflanze und deren Vermehrungsgut, regeneriert aus einer Zelle nach Anspruch 7 oder 8.
10. Verwendung der DNA-Sequenzen nach Anspruch 1 und 4 zur Steigerung der Genexpression in Pflanzenzellen.

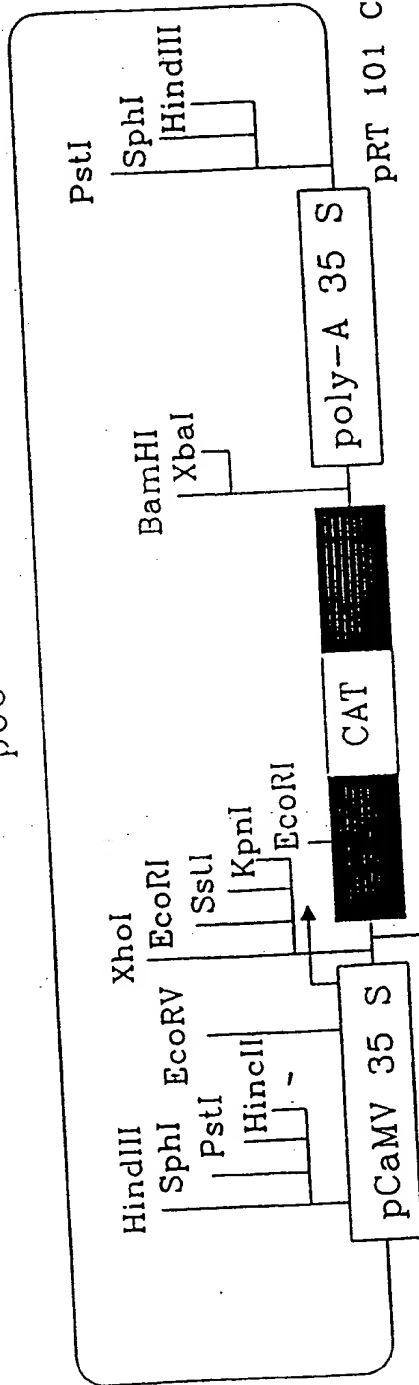
Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

— Leerseite —

BLANK PAGE

Fig. 1

pUC



A

B

C

D

pRT-ex/s-CAT

pRT-int/s-CAT

pRT-ex/s-int/s-CAT

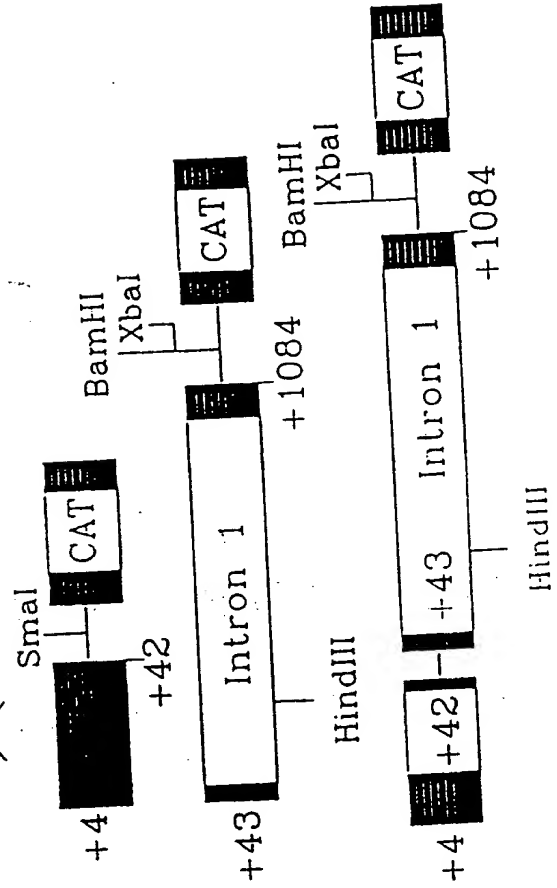


Fig. 2

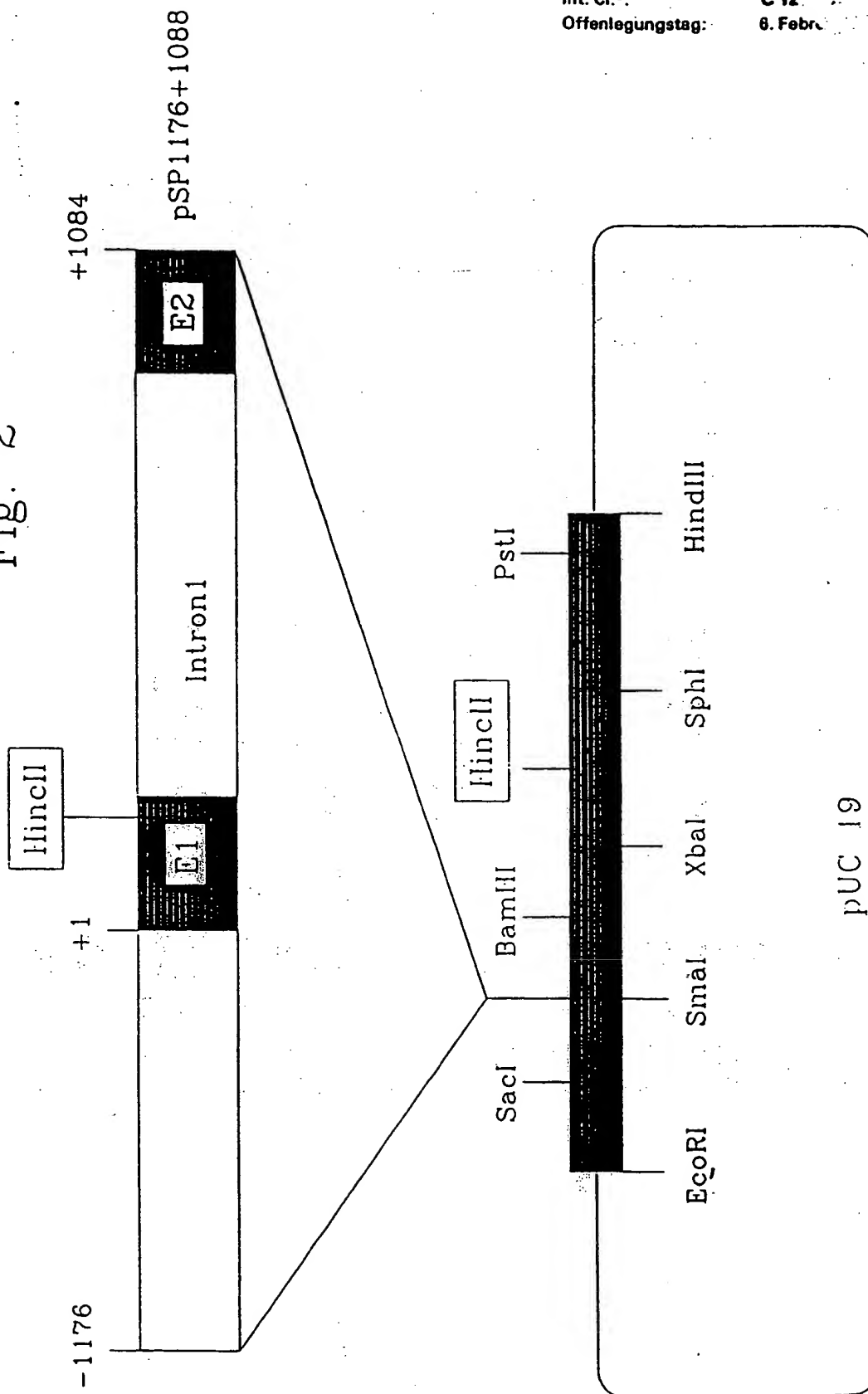
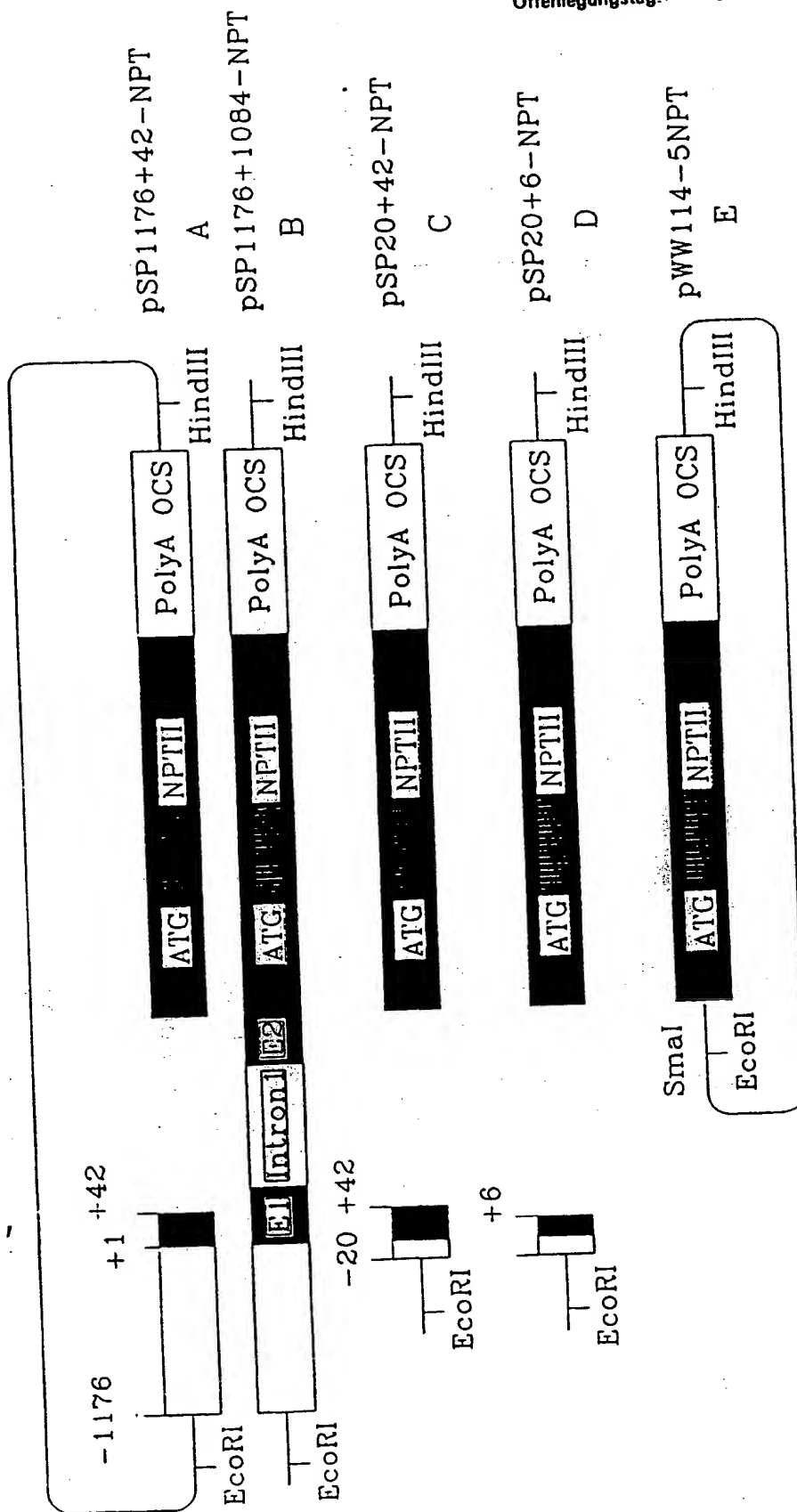


Fig. 3

pUC-Plasmid



pUC-Plasmid

Nummer:
Int. Cl. 5:
Offenlegungstag:

DE 41 24 537 A1
C 12 N 15/11
6. Februar 1992

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

BLANK PAGE